

บทบรรณาธิการ

The impact of next-generation sequencing on clinical histocompatibility testing

ดวงตะวัน ธรรมานิชานนท์

ห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

บทนำ

Next-generation sequencing (NGS) เป็นเทคโนโลยีที่สามารถหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมได้เป็นปริมาณมาก (high throughput) และสามารถทดสอบสิ่งส่งตรวจพร้อมกันได้หลายตัวอย่างทดสอบ (multiplexing) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการศึกษาวิจัยทางพันธุกรรมและการตรวจ human leukocyte antigen (HLA) typing ในห้องปฏิบัติการทางคลินิก¹ จุดเด่นของการนำเทคนิค NGS มาใช้ในการตรวจ HLA typing คือ การได้รับข้อมูลนอกเหนือจากบริเวณ antigen recognition do main (ARD) จึงสามารถนำข้อมูลนี้มาศึกษาถึงความสำคัญของโมเลกุล HLA บริเวณอื่น เช่น บริเวณ cytoplasmic region, transmembrane region และ non-coding region ผลการศึกษาวิจัยโดยใช้เทคนิค NGS พบว่า ข้อมูลลำดับเบสบริเวณที่นอกเหนือจาก ARD ที่มีความหลากหลาย ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน HLA² วิวัฒนาการของการควบคุมการแสดงออกของ HLA lineage (lineage-specific expression)³ และความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน HLA ต่อการเกิดโรค⁴ อย่างไรก็ตามการนำข้อมูลนอกเหนือจากบริเวณ ARD มาประยุกต์ใช้ในทางคลินิกยังไม่มีแนวทางปฏิบัติชัดเจน จำเป็นต้องมีข้อมูลการศึกษาวิจัยเพิ่มขึ้นเพื่อนำไปสู่แนวทางปฏิบัติในอนาคต ปัจจุบันประโยชน์ของข้อมูลในบริเวณนอกเหนือจาก ARD ที่ได้รับจากเทคนิค NGS ที่เห็นเด่นชัดคือ การนำข้อมูลมาประมวลผลและวิเคราะห์ผลเพื่อช่วยลด phase ambiguity ห้องปฏิบัติการจึงสามารถรายงานผล HLA typing ได้อย่างถูกต้องและมั่นใจ

บทความนี้จะกล่าวถึงข้อดี ข้อจำกัดและการประยุกต์เทคนิค NGS เพื่อนำมาตรวจ HLA typing ในผู้ป่วยปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต (hematopoietic stem cell transplantation) และผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะ (solid organ transplantation)

Technology perspective

การตรวจ HLA typing โดยใช้ sequencing-based typing (SBT) ซึ่งเป็นการหาลำดับเบสแบบดั้งเดิม ครอบคลุม exon 2 ถึง exon 4 ของ HLA class I และ exon 2 ถึง exon 3 สำหรับ

HLA class II เนื่องจากไม่ได้ตรวจครอบคลุมทั้งยีน HLA จึงทำให้เกิด phase ambiguity และ ambiguity จากความแตกต่างของ non-coding region ได้ การตรวจ HLA typing โดยใช้ SBT พบรายงานการเกิด ambiguity ร้อยละ 24 ถึงร้อยละ 53 ขึ้นกับตำแหน่งยีน HLA และเวอร์ชันของระบบฐานข้อมูล (HLA database) ที่ใช้วิเคราะห์⁵⁻⁷ ในขณะที่การตรวจ HLA typing โดยใช้ NGS ครอบคลุมทุก exons และเกือบทั้งหมดของ intron ของยีน HLA ดังนั้นจึงสามารถลดการเกิด ambiguity ได้

เทคนิค NGS แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ second-generation sequencing และ third-generation sequencing ความแตกต่างที่สำคัญระหว่างทั้งสองแบบคือ ความยาวของสายดีเอ็นเอในขั้นตอนการวิเคราะห์ลำดับเบส second-generation sequencing ใช้หลักการ short-read คือการอ่านลำดับเบสจากดีเอ็นเอสายสั้น (2501,000- คู่เบส)⁸ ในขั้นตอนการประมวลผลจะนำข้อมูลลำดับเบสจากดีเอ็นเอสายสั้นจำนวนมากมาเชื่อมต่อกันและเปรียบเทียบกับลำดับเบสของจีโนมอ้างอิงด้วยซอฟต์แวร์ ส่วน third-generation sequencing ใช้หลักการ long-read คือการอ่านลำดับเบสจากดีเอ็นเอสายยาว ซึ่งยาวได้มากถึง 10,000 คู่เบส third-generation sequencing มีข้อดีคือ ข้อมูลที่ได้รับเป็นลำดับเบสจากดีเอ็นเอสายยาว จึงสามารถต่อข้อมูลลำดับเบสโดยไม่ต้องเทียบลำดับเบสกับข้อมูลจีโนมอ้างอิง (de novo assembly) แต่มีข้อเสียคือ อัตราการอ่านลำดับเบสผิดพลาดสูง^{9,10} ปัจจุบันเทคนิค NGS ที่นิยมใช้ตรวจ HLA typing ในห้องปฏิบัติการทางคลินิกคือ second-generation sequencing ได้แก่ Illumina และ Ion Torrent

ข้อดีของ NGS

ลักษณะสำคัญของ NGS คือ ข้อมูลลำดับเบสที่ได้รับมีจำนวนมหาศาล วิเคราะห์ลำดับเบสของยีน HLA หลายตำแหน่งได้พร้อมกัน และทำการตรวจวิเคราะห์จากสิ่งส่งตรวจหลายตัวอย่างพร้อมกันได้ ส่งผลให้สามารถลดต้นทุนการทดสอบต่อสิ่งส่งตรวจ นอกจากนี้เทคนิค NGS สามารถลดการเกิด ambiguity ได้ เนื่องจากเป็นการหาลำดับเบสจากดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยว และตรวจครอบคลุมทั้งยีน HLA¹¹⁻¹³

ข้อจำกัดของ NGS

แม้ว่าเทคนิค NGS มีข้อดีหลายประการ แต่มีข้อจำกัดซึ่งห้วงปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ HLA typing ควรพิจารณาข้อจำกัดที่สนใจไปใช้ดังนี้ 1) การติดตั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ในระยะแรกมีค่าใช้จ่ายสูง 2) ระยะเวลาการทดสอบที่ยาวนาน การตรวจ HLA typing ด้วย NGS ใช้เวลาการทดสอบหลายวัน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เทคนิค polymerase chain reaction sequence-specific primers (PCR-SSP) และ PCR-sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO)¹⁴ รอบเวลารอคอย (turn-around time) ที่ยาวนานของ NGS จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจ HLA typing ในผู้บริจาคอวัยวะสมองตายซึ่งต้องการผลเร่งด่วน 3) ปัญหา phasing ambiguity สูงในบางตำแหน่ง เช่น HLA-DPB1 จากรายงานของ Duke และคณะ ได้พบการเกิด ambiguity ในตำแหน่ง HLA-DPB1 สูงถึงร้อยละ 25¹⁵ การใช้ NGS ในรูปแบบที่อ่านลำดับเบสจากดีเอ็นเอสายสั้น (Illumina และ Ion Torrent) ไม่สามารถลดปัญหานี้ได้ มีรายงานการศึกษาพบว่า third-generation sequencing ซึ่งเป็นการอ่านลำดับเบสจากดีเอ็นเอสายยาวสามารถแก้ปัญหา phase ambiguity ในตำแหน่ง HLA-DPB1 ได้¹⁶ แต่การใช้ซอฟต์แวร์ยังมีความยุ่งยากและเทคนิค third-generation sequencing ยังอยู่ในขั้นตอนพัฒนาเทคโนโลยีให้ดีขึ้น ในอนาคตเมื่อเทคโนโลยีการตรวจของ third-generation sequencing ได้รับการพัฒนาให้ดีขึ้นอาจจะเหมาะสมในการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทางคลินิก 4) ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ยุ่งยากซับซ้อน ขั้นตอนแรกของการตรวจวิเคราะห์สำหรับเทคนิค NGS คือ การเตรียมคลังดีเอ็นเอ (library preparation) เป็นขั้นตอนที่ส่วนใหญ่ใช้การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี manual และผู้ทำการตรวจวิเคราะห์ต้องได้รับการฝึกฝนให้มีความชำนาญในการปฏิบัติงาน ในการเตรียมคลังดีเอ็นเอนี้ ยังแบ่งได้เป็นขั้นตอนย่อยอีกหลายขั้นตอนได้แก่ การทำพีซีอาร์ (PCR amplification), DNA fragmentation, adapter ligation, size selection and secondary amplification, library quantitation และ library pooling ในขั้นตอนการวัดและคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ (library quantitation) เป็นขั้นตอนที่สำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากเทคนิค NGS เป็นการทดสอบที่ตรวจสอบส่งตรวจพร้อมกันได้หลายตัวอย่างทดสอบ ดังนั้นปริมาณดีเอ็นเอของผู้ป่วยแต่ละรายและแต่ละตำแหน่งต้องมีปริมาณเท่าๆ กัน การวัดและคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ (library quantitation) จึงมีความสำคัญมากเพื่อให้ข้อมูลลำดับเบสของแต่ละอัลลีลมีความสมดุล¹⁶ หากปริมาณดีเอ็นเอมากเกินไปจะส่งผลให้เกิดการอ่านลำดับเบสผิดพลาด มีการผสมของลำดับเบส นอกจากขั้นตอนการวัดและคำนวณปริมาณดีเอ็นเอแล้ว ขั้นตอนอื่นก็มีความสำคัญและผู้ปฏิบัติงานต้องระมัดระวังเนื่องจากจะส่งผลให้ข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ผิดพลาดได้

Impact of NGS on histocompatibility testing

การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต (hematopoietic stem cell transplantation; HSCT)

การนำเทคนิค NGS มาใช้ในการตรวจ HLA typing จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและคุณภาพของผลการตรวจให้ดียิ่งขึ้น เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต ผู้ป่วยและผู้บริจาคจะได้รับผลการตรวจ HLA typing ในระดับความละเอียดสูงที่สุด ผลการตรวจ HLA typing ของผู้บริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต (stem cell donor registry) ที่มีความละเอียดสูงและไม่เกิด ambiguity ส่งผลให้ขั้นตอนการค้นหาลูกผู้บริจาคที่มีอัลลีล HLA ตรงกันทุกตำแหน่ง (HLA-matched donor) เป็นไปอย่างรวดเร็ว Sauter และคณะ ได้ศึกษาการจำลองการค้นหาลูกผู้บริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในทะเบียนเสมือนจริง (virtual donor registry)¹⁷ พบว่าสัดส่วนของผู้บริจาคในทะเบียนเสมือนจริงที่มีผลการตรวจ HLA typing ไม่สมบูรณ์เป็นจำนวนมาก สัมพันธ์กับความล้มเหลวในการพบผู้บริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่มีอัลลีล HLA ตรงกันทุกตำแหน่ง การเพิ่มจำนวนผู้บริจาคในธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตให้มีผลการตรวจ HLA typing แบบสมบูรณ์เป็นประโยชน์ต่อการค้นหาลูกผู้บริจาคที่มี HLA-matched ให้ประสบความสำเร็จมากขึ้น¹⁷ เมื่อพิจารณาถึงค่าใช้จ่ายและผลประโยชน์ที่ได้รับแล้ว การนำเทคนิค NGS มาใช้ตรวจ HLA typing ในผู้ป่วยและผู้บริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่มีความคุ้มค่าเป็นอย่างมาก

การปลูกถ่ายอวัยวะ (solid organ transplantation)

การตรงกันระหว่างแอนติเจน HLA ของผู้ป่วยและผู้บริจาคมีความสำคัญต่อการปลูกถ่ายอวัยวะ มีหลักฐานจากหลายการศึกษาพบว่า การตรงกันระหว่างแอนติเจน HLA ของผู้ป่วยและผู้บริจาคมีความสัมพันธ์กับอัตราการอยู่รอดของอวัยวะปลูกถ่ายที่ยาวขึ้นและผลการปลูกถ่ายที่ดีขึ้น^{18,19} การพิจารณาการตรงกันของแอนติเจน HLA ในผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะโดยปกติพิจารณาแอนติเจนในระดับการตรวจทางซีโรโลยี (serologically defined HLA antigen) ซึ่งถือว่ามีความละเอียดระดับต่ำ เมื่อการตรวจ HLA typing ถูกพัฒนาให้ได้ผลระดับความละเอียดสูง จึงพบข้อจำกัดหลายประการจากการพิจารณาการตรงกันของแอนติเจน HLA ในระดับความละเอียดต่ำ²⁰ แนวคิดในการนำเทคนิค NGS มาใช้ตรวจ HLA typing สำหรับผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะได้รับการนำเสนอและตีพิมพ์อย่างกว้างขวาง²¹⁻²⁴

การนำเทคนิค NGS มาใช้ในการตรวจ HLA typing ให้ได้ผลระดับความละเอียดสูงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะจากผู้บริจาคที่มีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณีผู้ป่วยที่

มีประวัติการสร้างแอนติบอดีต่อ HLA การตรวจ HLA typing ในระดับความละเอียดสูงทั้งผู้ป่วยและผู้บริจาคอวัยวะด้วยเทคนิค NGS ร่วมกับการตรวจความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ HLA จะทำให้สามารถวิเคราะห์และคัดเลือกผู้บริจาคที่เหมาะสม^{21,24} อีกทั้งการตรวจ HLA typing ที่กล่าวข้างต้นจะทำให้สามารถวิเคราะห์ epitope mismatching ระหว่างผู้ป่วยและผู้บริจาคอวัยวะเพื่อประเมินความเสี่ยงทางภูมิคุ้มกันได้ถูกต้องและละเอียดมากขึ้น²⁵⁻²⁷ ในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายอวัยวะที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA ของผู้บริจาค (donor-specific HLA antibody; DSA) การตรวจ HLA typing ในระดับความละเอียดสูงทั้งผู้ป่วยและผู้บริจาคอวัยวะจะช่วยให้ห้องปฏิบัติการสามารถวิเคราะห์และติดตาม DSA ได้อย่างถูกต้อง²¹

การตรวจ HLA typing ในระดับความละเอียดสูงมีประโยชน์ในผู้ป่วยรอรับอวัยวะจากผู้บริจาคสมองตายด้วยเช่นกัน ในผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีต่ออัลลีล HLA (allele-specific antibody) การวิเคราะห์โดยใช้ผล HLA typing ในระดับความละเอียดสูงของผู้ป่วยจะทำให้สามารถรายงาน unacceptable antigen ได้อย่างถูกต้อง²⁸ ตัวอย่างเช่น ผู้ป่วยรอรับไตบริจาคอายุ 16 ปี มีค่า calculated panel reactive antibody (cPRA) 100% และมีแอนติบอดีจำเพาะต่อ DRB1*04:02 (แต่ไม่พบแอนติบอดีต่ออัลลีลอื่นของ DR4) ผู้ป่วยมีผล typing เป็น HLA-DRB1*04 ห้องปฏิบัติการไม่สามารถตัดสินใจได้ว่าจะรายงานผล DR4 เป็น unacceptable antigen หรือไม่ เนื่องจากผล HLA typing ในระดับความละเอียดต่ำของผู้ป่วยทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้แน่ชัดว่าแอนติบอดีต่อ DRB1*04:02 เป็น alloantibody หรือไม่ เมื่อห้องปฏิบัติการตรวจ HLA typing ในระดับความละเอียดสูงและพบว่าผู้ป่วยมี HLA-DRB1*04:08 จึงสามารถรายงาน DRB1*04:02 เป็น unacceptable antigen ในระบบ United Network for Organ Sharing (UNOS) ได้²¹ หากห้องปฏิบัติการไม่มีผลการตรวจ HLA typing ในระดับความละเอียดสูง และรายงาน DR4 เป็น unacceptable antigen จะทำให้โอกาสในการที่ผู้ป่วยจะได้รับไตบริจาคลดลง

โดยสรุป การตรวจ HLA typing ด้วยเทคนิค NGS มีทั้งข้อดีและข้อจำกัด การนำเทคนิค NGS มาใช้ในการตรวจ HLA typing สำหรับผู้ป่วยและผู้บริจาคทั้งการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด เม็ดโลหิตและการปลูกถ่ายอวัยวะได้รับความสนใจมากขึ้น ข้อมูลซึ่งได้รับจากเทคนิค NGS ที่มีความละเอียดและสมบูรณ์มากขึ้นอาจจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงแนวทางปฏิบัติในการดูแลรักษาผู้ป่วยในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Bravo-Egana V, Monos D. The impact of next-generation sequencing in immunogenetics: current status and future directions. *Curr Opin Organ Transplant*. 2017;22:400-6.
2. Shieh M, Chitnis N, Clark P, Johnson FB, Kamoun M, Monos D. Computational assessment of miRNA binding to low and high expression HLA-DPB1 allelic sequences. *Hum Immunol*. 2019;80:53-61.
3. Kulkarni S, Ramsuran V, Rucevic M, Singh S, Lied A, Kulkarni V, et al. Posttranscriptional regulation of HLA-A protein expression by alternative polyadenylation signals involving the RNA-binding protein syncrip. *J Immunol*. 2017;199:3892-9.
4. Pelikan RC, Kelly JA, Fu Y, Lareau CA, Tessneer KL, Wiley GB, et al. Enhancer histone-QTLs are enriched on autoimmune risk haplotypes and influence gene expression within chromatin networks. *Nat Commun*. 2018;9:2905. doi: 10.1038/s41467-018-05328-9.
5. Adams SD, Barracchini KC, Chen D, Robbins F, Wang L, Larsen P, et al. Ambiguous allele combinations in HLA Class I and Class II sequence-based typing: when precise nucleotide sequencing leads to imprecise allele identification. *J Transl Med*. 2004;2:30. doi: 10.1186/1479-5876-2-30.
6. Voorter CE, Mulkers E, Liebelt P, Sleyster E, van den Berg-Loonen EM. Reanalysis of sequence-based HLA-A, -B and -Cw typings: how ambiguous is today's SBT typing tomorrow. *Tissue Antigens*. 2007;70:383-3.
7. Weimer ET, Montgomery M, Petrarola R, Crawford J, Schmitz JL. Performance characteristics and validation of next-generation sequencing for human leucocyte antigen typing. *J Mol Diagn*. 2016;18:668-75.
8. Carapito R, Radosavljevic M, Bahram S. Next-generation sequencing of the HLA locus: methods and impacts on HLA typing, population genetics and disease association studies. *Hum Immunol*. 2016;77:1016-23.
9. Jain M, Tyson JR, Loose M, Ip CLC, Eccles DA, O'Grady J, et al. MinION analysis and reference consortium: phase 2 data release and analysis of R9.0 chemistry. *F1000Res*. 2017;6:760. doi: 10.12688/f1000research.11354.1.
10. Magi A, Giusti B, Tattini L. Characterization of MinION nanopore data for resequencing analyses. *Brief Bioinform*. 2017;18:940-53.
11. Gandhi MJ, Ferriola D, Huang Y, Duke JL, Monos D. Targeted next-generation sequencing for human leukocyte antigen typing in a clinical laboratory: metrics of relevance and considerations for its successful implementation. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141:806-12.
12. Weimer ET. Clinical validation of NGS technology for HLA: an early adopter's perspective. *Hum Immunol*. 2016;77:820-3.

13. Yin Y, Lan JH, Nguyen D, Valenzuela N, Takemura P, Bolon YT, et al. Application of high-throughput next-generation sequencing for HLA typing on buccal extracted DNA: results from over 10,000 donor recruitment samples. *PLoS One*. 2016;11:e0165810. doi: 10.1371/journal.pone.0165810.
14. Duncikley H. HLA typing by SSO and SSP methods. *Methods Mol Biol*. 2012;882:9-25.
15. Duke JL, Mosbrugger TL, Ferriola D, Chitnis N, Hu T, Tairis N, et al. Resolving MiSeq-generated ambiguities in HLA-DPB1 typing by using the Oxford Nanopore Technology. *J Mol Diagn*. 2019;21:852-61.
16. Yin Y, Butler C, Zhang Q. Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Hum Immunol*. 2021;82:812-9.
17. Sauter J, Solloch UV, Giani AS, Hofmann JA, Schmidt AH. Simulation shows that HLA-matched stem cell donors can remain unidentified in donor searches. *Sci Rep*. 2016;6:21149. doi: 10.1038/srep21149.
18. Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Wilk AR, Robinson A, et al. OPTN/SRTR 2016 annual data report: kidney. *Am J Transplant*. 2018;18(Suppl 1):18-113.
19. Opelz G, Wujciak T, Dohler B, Scherer S, Mytilineos J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative transplant study. *Rev Immunogenet*. 1999;1:334-42.
20. O'Connell PJ. Presidential address: 50 years of progress-more challenges ahead. *Transplantation*. 2016;100:2493-5.
21. Huang Y, Dinh A, Heron S, Gasiewski A, Kneib C, Mehler H, et al. Assessing the utilization of high-resolution 2-field HLA typing in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2019;19:1955-63.
22. Meneghini M, Perona A, Crespo E, Bemelman F, Reinke P, Viklicky O, et al. On the clinical relevance of using complete high-resolution HLA typing for an accurate interpretation of posttransplant immune-mediated graft outcomes. *Front Immunol*. 2022;13:924825. doi: 10.3389/fimmu.2022.924825.
23. Smith AG, Pereira S, Jaramillo A, Stoll ST, Khan FM, Berka N, et al. Comparison of sequence-specific oligonucleotide probe vs next generation sequencing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3/B4/B5, DQA1, DQB1, DPA1, and DPB1 typing: Toward single-pass high-resolution HLA typing in support of solid organ and hematopoietic cell transplant programs. *HLA*. 2019;94:296-306.
24. Zavyalova D, Abraha J, Rao P, Morris GP. Incidence and impact of allele-specific anti-HLA antibodies and high-resolution HLA genotyping on assessing immunologic compatibility. *Hum Immunol*. 2021;82:147-54.
25. Charnaya O, Levy Erez D, Amaral S, Monos DS. Pediatric kidney transplantation-can we do better? The promise and limitations of epitope/epitope matching. *Front Pediatr*. 2022;10:893002. doi: 10.3389/fped.2022.893002.
26. Hiho SJ, Walton DC, Paraskeva MA, Levvey BJ, Diviney MB, Snell GI, et al. Determining clinical thresholds for donor HLA eplet compatibility to predict best outcomes following lung transplantation. *Transplant Direct*. 2022;8:e1364. doi: 10.1097/TXD.0000000000001364.
27. Larkins NG, Wong G, Taverniti A, Lim WH. Epitope matching in kidney transplantation: recent advances and current limitations. *Curr Opin Organ Transplant*. 2019;24:370-7.
28. Larkins NG, D'Orsogna L, Taverniti A, Sharma A, Chakera A, Chan D, et al. The accuracy of sequence-specific oligonucleotide and real-time polymerase chain reaction HLA typing in determining the presence of pre-transplant donor-specific anti-HLA antibodies and total eplet mismatches for deceased donor kidney transplantation. *Front Immunol*. 2022;13:844438. doi: 10.3389/fimmu.2022.844438.